

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Нагибиной Галины Сергеевны «Метод стабилизации структуры белков, основанный на определении и закреплении их «ослабленных» участков», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «биофизика».

Работа Нагибиной Г.С. посвящена разработке и проверке подхода, позволяющего стабилизировать глобулярные белки. Суть подхода заключается в поиске ослабленных участков полипептидной цепи с помощью программ-предсказателей нативно-развернутых участков с последующим их закреплением дисульфидной связью. Повышение стабильности белков – актуальная задача современной промышленной биотехнологии и биофармацевтики. Сайт-направленный мутагенез с целью введения дополнительных дисульфидных связей является распространённым методом стабилизации целевых белков. Однако введение таких связей не всегда приводит к ожидаемому эффекту, а в некоторых случаях даже снижает стабильность белка. В связи с этим, важным остаётся вопрос выбора участка полипептидной цепи для введения соответствующих аминокислотных замен.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Нагибиной Г.С. построена по традиционному плану. Во введении автор приводит актуальность темы диссертационного исследования, формулирует цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Также даётся краткое описание методологии диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов.

Обзор литературы содержит три части, первая из которых посвящена описанию природных и искусственно вводимых дисульфидных связей в белках, а также влиянию различных параметров на её стабилизирующий эффект. Несмотря на большое количество примеров успешной стабилизации белков искусственными дисульфидными связями, остаётся открытым вопрос об их влиянии на подвижные участки белка. Далее автор приводит достаточно подробный обзор программ, предсказывающих нативно-развернутые участки в белках, с оценкой эффективности их работы. Наконец, третья часть обзора литературы посвящена характеристике белков, используемых в работе.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание процедуры выделения и очистки используемых в работе белков, биохимических, физико-химических и

биоинформатических методов исследований. В целом, использованные методы современны и адекватны поставленным задачам.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор приводит результаты апробации разрабатываемого метода стабилизации глобулярных белков за счёт введения дисульфидных связей на трёх белках. Для поиска «ослабленных» участков использовались программы PONDR-FIT и IsUnstruct, находящиеся в открытом доступе в сети Интернет и доказавшие свою эффективность. Введение дисульфидной связи в предсказанный ослабленным участок α -субъединицы G_0 -белка *Drosophila melanogaster* ($G\alpha_0$) привело к повышению термостабильности одного из его доменов на 4°C. Для проверки гипотезы о том, что основным параметром, влияющим на стабилизацию белка при введении мутации, является именно предсказанная ослабленность участка полипептидной цепи белка, а не особенности вторичной или третичной структуры, автор исследовал два белка, одинаковых по структуре, но отличающихся по аминокислотной последовательности. Показано, что введение дисульфидной связи в участок белка L1 из *Haloarcula marismortui* (HmaL1), предсказанный «не ослабленным», не повлияло на стабильность его структуры. Закрепление же дисульфидным мостиком предсказанного «ослабленным» участка белка L1 из *Aquifex aeolicus* (AaeL1), имеющего схожую с HmaL1 пространственную структуру, но низкую идентичность (33%) аминокислотной последовательности, привело к повышению термостабильности белка на 10°C. Важно, что автором также была проведена оценка влияния вводимой мутации на функциональную активность AaeL1, а именно его способность связывать рРНК.

По результатам работы сформулированы 4 вывода, соответствующие поставленным задачам.

Замечания по работе

1. В обзоре литературы часто встречается термин «стабильность» белков, при этом не указано, какой именно параметр приводится в цитируемой работе (термостабильность, устойчивость к денатурантам или др.).
2. Для подтверждения наличия мутаций, вводимых автором, необходимо привести данные масс-спектрометрического анализа.
3. В работе отсутствуют данные о влиянии введённой в $G\alpha_0$ мутации на сродство к ГДФ. Поскольку степень насыщения мутантного белка лигандом может отличаться от таковой для дикого типа, сравнивать их кривые плавления в присутствии одинаковых концентраций ГДФ некорректно.

4. Без применения общепринятых методов количественной оценки содержания элементов вторичной структуры белков (например, с использованием программного обеспечения CDPPro) трудно оценить изменение доли отдельных элементов вторичной структуры белка HmaL1, тем более, что измерения проводились в присутствии экстремально высоких концентраций хлорида, который поглощает в дальней УФ области.

5. На стр.100 автор пишет «Видно, что белок HmaL1 дикого типа плавится при 55 градусах, в то время как белок HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью плавится в 65 градусах». Корректно говорить, что *середины тепловых переходов* белков дикого типа и HmaL1-E82C-D114C составили 55 и 65°C, соответственно.

6. Не понятно, как рассчитывалась доля нативного состояния белка HmaL1 дикого типа и мутантной формы из температурной зависимости молярной эллиптичности на рисунке 17Б, и каким образом были определены середины тепловых переходов.

7. В выводе 3 говорится о том, что «закрепление дисульфидной связью (D101C-K124C) предсказанного «не ослабленным» участка белка AaeL1 никак не повлияло на стабильность его структуры». На мой взгляд, такой вывод не является полностью обоснованным, поскольку речь идёт о частично денатурированных мочевиной белках AaeL1 и его мутантной форме. В этой связи, выбор белка AaeL1, обладающего крайне высокой термостабильностью (тепловой переход выше 100°C), в качестве объекта исследования вызывает вопросы.

8. В тексте диссертации встречается ряд ошибок и неточностей. Например, на рисунках 4 и 12 ось X следует подписывать как «*вероятность а.о. быть неупорядоченным*», а не «*неупорядоченность*». На рисунке 14 корректно использовать название оси X «*интенсивность флуоресценции на выбранной длине волны*» вместо «*флуоресценция*».

В целом, упомянутые замечания не умаляют достоинств работы. Результаты работы полностью опубликованы в престижных российских и международных научных журналах (5 статей), а также апробированы на ряде конгрессов, конференций и форумов. Содержание автореферата полностью соответствует основным идеям и выводам диссертации.

Заключение

Диссертация Галины Сергеевны Нагибиной представляет собой законченное научное исследование, вносящее существенный вклад в развитие методов стабилизации глобулярных белков. Достоверность и обоснованность результатов не вызывает сомнений,

а предложенный в работе подход является новым инструментом, который может быть использован в области белковой инженерии, биотехнологии и фармакологии.

На основании всего вышеизложенного считаю, что работа Нагибиной Г.С. полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор достоин присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «биофизика».

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Лаборатории новых методов в биологии
Института биологического приборостроения
с опытным производством Российской академии наук –
обособленного подразделения Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр «Пушчинский
научный центр биологических исследований
Российской академии наук»

29.09.2020

Немашкалова Екатерина Леонидовна

Подпись удостоверено

Ст. инсп. по кадрам

Т. Ю. Васильева



Сведения об оппоненте

Немашкалова Екатерина Леонидовна

Ученая степень, звание: Кандидат биологических наук (специальность 03.01.02 – биофизика).

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) Институт биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБП РАН)

Должность: научный сотрудник.

Адрес организации: 142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 7

Адрес эл. почты организации: ibp@ibp-ran.ru

Телефон: (495) 143-77-41

Факс: (4967) 33-0522

Сайт организации: <http://www.ibp-ran.ru/>

Научные публикации ведущего оппонента по тематике диссертационного исследования Нагибиной Г.С. за последние пять лет (2015-2020 гг.):

1. Permyakov SE, Vologzhannikova AS, Nemashkalova EL, Kazakov AS, Denesyuk AI, Denessiouk K, Baksheeva VE, Zamyatnin AA Jr, Zernii EY, Uversky VN, Permyakov EA. Experimental Insight into the Structural and Functional Roles of the 'Black' and 'Gray' Clusters in Recoverin, a Calcium Binding Protein with Four EF-Hand Motifs. *Molecules*. 2019 Jul 8;24(13). pii: E2494. doi: 10.3390/molecules24132494.
2. Nemashkalova EL, Permyakov EA, Uversky VN, Permyakov SE, Litus EA. Effect of Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on human serum albumin interaction with plasma unsaturated fatty acids. *Int J Biol Macromol*. 2019 Jun 15;131:505-509. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.085. Epub 2019 Mar 14.
3. Litus EA, Kazakov AS, Sokolov AS, Nemashkalova EL, Galushko EI, Dzhus UF, Marchenkov VV, Galzitskaya OV, Permyakov EA, Permyakov SE. The binding of monomeric amyloid β peptide to serum albumin is affected by major plasma unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Mar 5;510(2):248-253. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.081. Epub 2019 Jan 23.
4. Zernii EY, Nazipova AA, Nemashkalova EL, Kazakov AS, Gancharova OS, Serebryakova MV, Tikhomirova NK, Baksheeva VE, Vladimirov VI, Zinchenko DV, Philippov PP, Senin II, Permyakov SE. Light-Induced Thiol Oxidation of Recoverin Affects Rhodopsin Desensitization. *Front Mol Neurosci*. 2019 Jan 7;11:474.

5. Deryusheva E, Nemashkalova E, Galloux M, Richard CA, Eléouët JF, Kovacs D, Van Belle K, Tompa P, Uversky V, Permyakov S. Does Intrinsic Disorder in Proteins Favor Their Interaction with Lipids? *Proteomics*. 2019 Mar;19(6):e1800098. doi: 10.1002/pmic.201800098. Epub 2019 Jan 25.
6. Deryusheva E, Machulin A, Nemashkalova E, Glyakina A, Galzitskaya O. Search for Functional Flexible Regions in the G-protein Family: New Reading of the FoldUnfold Program. *Protein Pept Lett*. 2018;25(6):589-598.
7. Vladimirov VI, Zernii EY, Baksheeva VE, Wimberg H, Kazakov AS, Tikhomirova NK, Nemashkalova EL, Mitkevich VA, Zamyatnin AA Jr, Lipkin VM, Philippov PP, Permyakov SE, Senin II, Koch KW, Zinchenko DV. Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1. *Cell Calcium*. 2018 Jul;73:55-69. doi: 10.1016/j.ceca.2018.04.003. Epub 2018 Apr 14.
8. Nemashkalova EL, Permyakov EA, Permyakov SE, Litus EA. Modulation of linoleic acid-binding properties of human serum albumin by divalent metal cations. *Biomaterials*. 2017 Jun;30(3):341-353. doi: 10.1007/s10534-017-0010-5. Epub 2017 Mar 16.